

## DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN .....	iv
SUMMARY .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
 I. PENDAHULUAN .....	 1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
 II TINJAUAN PUSTAKA .....	 4
2.1 Rumput Laut .....	4
2.2 Karagenan .....	5
2.3 Limbah Karagenan .....	7
2.4 Lignoselulosa .....	8
2.4.1 Lignin .....	8
2.4.2 Selulosa .....	9
2.5 Enzim Selulase .....	10
2.5.1 Klasifikasi Enzim Selulase .....	11
2.5.2 Struktur Molekuler Enzim Selulase .....	16
2.5.3 Mikroorganisme Penghasil Selulase .....	17
2.5.4 Pemanfaatan Enzim Selulase .....	18
2.6 <i>Pretreatment</i> Lignoselulosa .....	20
2.7 Isolasi Mikroorganisme Termofilik Selulolitik .....	23
2.8 Identifikasi Bakteri .....	25
2.8.1 Metode Konvensional : Identifikasi Fisiologi dan Morfologi .....	25
2.8.2 Metode Molekuler : Identifikasi 16S-rRNA .....	27
2.9 Karakterisasi Enzim .....	30
2.9.1 Penentuan Massa Molekul .....	30
2.9.2 Penentuan Sifat Enzim .....	32

2.10	Hidrolisis Enzimatis Limbah Karagenan.....	35
III.	KERANGKA KONSEP PENELITIAN .....	39
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	39
3.2	Kerangka Operasional Penelitian.....	40
IV.	METODOLOGI PENELITIAN .....	42
4.1	Tempat dan Waktu Penelitian.....	42
4.2	Alat dan Bahan Penelitian.....	42
4.2.1	Alat.....	42
4.2.2	Bahan.....	42
4.3	Pelaksanaan Penelitian .....	43
4.3.1	Pengambilan Sampel.....	43
4.3.2	Isolasi dan Skrining Mikroba Selulolitik .....	44
4.3.2.1	Uji Kualitatif Selulolitik.....	44
4.3.2.2	Uji Kuantitatif Selulolitik .....	45
4.3.3	Deteksi Mikroba Penghasil Selulase.....	46
4.3.3.1	Karakteristik Morfologi dengan Pewarnaan Gram.....	46
4.3.3.2	Identifikasi Bakteri secara Molekuler.....	47
4.3.3.2.1	Ekstraksi dan Purifikasi DNA .....	47
4.3.3.2.2	Amplifikasi <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	49
4.3.3.2.3	Purifikasi Produk <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	50
4.3.3.2.4	Sekuensing.....	50
4.3.3.2.5	Elektroforesis.....	51
4.3.3.2.6	Hasil Sekuensing.....	51
4.3.4	<i>Pretreatment</i> Limbah Karagenan.....	53
4.3.5	Pembuatan Starter .....	53
4.3.6	Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	54
4.3.7	Produksi Enzim Selulase .....	54
4.3.8	Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase.....	55
4.3.8.1	Penentuan Masa Molekul .....	55
4.3.8.2	Aktivitas Enzim .....	55
4.3.8.2.1	Aktivitas Enzim pada pH Optimum.....	55
4.3.8.2.2	Aktivitas Enzim pada Suhu Optimum.....	56
4.3.8.2.3	Pengaruh Penambahan Ion Logam .....	56
4.3.8.2.4	Kestabilan Enzim pada Suhu Optimum.....	57
4.3.8.2.5	Substrat Spesifik.....	57

4.3.9	Aplikasi pada Limbah Karagenan yang sudah di- <i>pretreatment</i> ....	57
4.3.9.1	Aplikasi menggunakan Isolat Terpilih.....	57
4.3.9.2	Aplikasi Menggunakan Ekstrak Kasar Enzim Isolat Terpilih .....	58
4.4	Analisa Data .....	58
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	59
5.1	Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase .....	59
5.1.1	Isolasi Bakteri Penghasil Selulase .....	59
5.1.2	Seleksi Isolat Bakteri Selulolitik .....	59
5.1.2.1	Uji Kualitatif Bakteri Selulolitik.....	59
5.1.2.2	Uji Kuantitatif Bakteri Selulolitik .....	61
5.1.3	Identifikasi Bakteri Penghasil Selulase.....	63
5.1.3.1	Uji Morfologi dan Biokimia Isolat Bakteri .....	63
5.1.3.2	Identifikasi Bakteri Secara Molekuler dengan 16S rRNA .....	64
5.2	Pertumbuhan Bakteri dan Produksi Enzim Selulase .....	69
5.3	Karakterisasi Ekstrak Kasar Selulase .....	71
5.3.1	Penentuan Suhu Optimal dan Stabilitas Suhu .....	71
5.3.2	Penentuan pH Optimal dan Stabilitas pH.....	74
5.3.3	Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Selulase .....	77
5.3.4	Pengaruh Subtrat Spesifik Terhadap Aktivitas Enzim .....	79
5.3.5	Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE dan Zimografi .....	81
5.4	Aplikasi Enzim Selulase dalam Hidrolisis Limbah Karagenan .....	82
5.4.1	Aplikasi Enzim Selulase Hidrolisis Limbah Karagenan.....	82
5.4.2	Aplikasi Produksi Enzim dengan Isolat Terpilih.....	84
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN .....	87
6.1	Kesimpulan.....	87
6.2	Saran.....	88
	DAFTAR PUSTAKA.....	89
	LAMPIRAN .....	96

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 <i>Family</i> Glikosida Hidrolase .....	12
Tabel 2.2 Mekanisme Kinetik Selulase dan Residu Katalitik <i>Family</i> GH .....	14
Tabel 2.3 Struktur Protein pada <i>Family</i> GH .....	17
Tabel 2.4 Metode <i>Pretreatment</i> Biomassa Lignoselulosa .....	21
Tabel 2.5 Tahapan Pewarnaan Gram.....	26
Tabel 4.1 Primer dalam PCR 16S .....	49
Tabel 4.2 Komponen Reaksi PCR Deteksi gen 16S .....	49
Tabel 4.3 Kondisi PCR Deteksi Gen 16S .....	49
Tabel 5.1 Nilai Indeks Selulolitik .....	60
Tabel 5.2 Nilai Aktivitas Selulase.....	62
Tabel 5.3 Nilai Indeks Selulolitik dan Aktivitas Enzim .....	62
Tabel 5.4 Hasil Uji Morfologi dan Biokimia.....	64
Tabel 5.5 Hasil Pengukuran NanoDrop Genomic DNA.....	64
Tabel 5.6 Kondisi PCR .....	65
Tabel 5.7 Hasil BLAST Isolat B15 dan C55 .....	67

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Beberapa Jenis Karagenan .....	6
Gambar 2.2 Proses ekstraksi kappa karagenan .....	7
Gambar 2.3 Struktur lignoselulosa .....	8
Gambar 2.4 Satuan penyusun lignin .....	9
Gambar 2.5 Struktur selulosa .....	9
Gambar 2.6 Mekanisme pemotongan endo- dan ekso- .....	11
Gambar 2.7 Hidrolisis Selulosa oleh Selulase.....	13
Gambar 2.8 Mekanisme Hidrolisis oleh Selulase .....	15
Gambar 2.9 Efek pretreatment terhadap stuktur biomassa lignoselulosa....	20
Gambar 2.10 Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif .....	26
Gambar 2.11 Struktur pohon filogenetik.....	29
Gambar 2.12 Mekanisme hidrolisis selulosa dengan enzim.....	37
Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian .....	39
Gambar 3.2 Kerangka operasional penelitian .....	40
Gambar 5.1 Zona Bening (1) dan Koloni Bakteri (2) pada Medium CMC ....	61
Gambar 5.2 Pewarnaan Gram Isolat B15 (A) dan C55 (B).....	63
Gambar 5.3 Hasil Purifikasi Produk PCR Isolat B15 (1) dan Isolat C55 (2).....	66
Gambar 5.4 Pohon Filogenetik Isolat B15 (A).....	68
Gambar 5.5 Pohon Filogenetik Isolat C55 (B).....	68
Gambar 5.6 Laju Pertumbuhan dan Produksi <i>Bacillus</i> sp. 13843 B15 .....	70
Gambar 5.7 Laju Pertumbuhan dan Produksi <i>Bacillus licheniformis</i> C55 ....	70
Gambar 5.8 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Selulase.....	72
Gambar 5.9 Stabilitas Suhu Enzim Selulase.....	73
Gambar 5.10 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim <i>Bacillus</i> sp.13843 B15 .....	74
Gambar 5.11 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim <i>Bacillus licheniformis</i> C55.....	75
Gambar 5.12 Aktivitas Relatif Enzim <i>Bacillus</i> sp.13843 B15 pada Beberapa pH .....	76
Gambar 5.13 Aktivitas Relatif Enzim <i>Bacillus licheniformis</i> C55 pada Beberapa pH.....	76
Gambar 5.14 Pengaruh Penambahan Ion logam terhadap Aktivitas Enzim <i>Bacillus</i> sp.13843 B15.....	78
Gambar 5.15 Pengaruh Penambahan Ion logam terhadap Aktivitas	

Enzim <i>Bacillus licheniformis</i> C55.....	78
Gambar 5.16 Pengaruh Substrat Spesifik Terhadap Aktivitas Enzim Selulase .....	80
Gambar 5.17 Hasil zimogram dan SDS PAGE .....	82
Gambar 5.18 Kadar Gula Pereduksi yang dihasilkan enzim selulase dari .....	83
Gambar 5.19 Kadar Gula Pereduksi yang dihasilkan enzim selulase dari <i>Bacillus licheniformis</i> C55 .....	84
Gambar 5.20 Aktivitas Enzim yang dihasilkan <i>Bacillus</i> sp.13843 B15 dengan substrat limbah karagenan .....	85
Gambar 5.21 Aktivitas Enzim yang dihasilkan <i>Bacillus licheniformis</i> C55 dengan substrat limbah karagenan .....	85

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian.....	96
Lampiran 1A. Preparasi Sampel.....	96
Lampiran 1B. Pengkayaan Sampel.....	96
Lampiran 1C. Isolasi Mikroorganisme .....	97
Lampiran 1D. Pembuatan Starter .....	98
Lampiran 1E. Pembuatan Kurva Pertumbuhan .....	98
Lampiran 1F. Produksi Enzim Selulase.....	99
Lampiran 1G. SDS-PAGE .....	99
Lampiran 1H. Zimogram.....	100
Lampiran 2. Prosedur Analisa.....	101
Lampiran 2A. Peremajaan Isolat .....	101
Lampiran 2B. Prosedur Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri .....	101
Lampiran 2C. Pengecatan Gram .....	101
Lampiran 2D. Pengecatan Endospora.....	101
Lampiran 2E. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase .....	102
Lampiran 2F. Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	102
Lampiran 2G. Penentuan Aktivitas Selulase pada pH Optimum .....	103
Lampiran 2H. Penentuan Aktivitas Selulase pada Suhu Optimum.....	103
Lampiran 3. Komposisi Media, Buffer dan Reagen Kimia .....	104
Lampiran 3A. Media CMC .....	104
Lampiran 3B. <i>Congo Red</i> .....	104
Lampiran 3C. Reagen DNS.....	104
Lampiran 3D. Larutan Stok $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	104
Lampiran 3E. Pereaksi Bradford .....	104
Lampiran 3F. Gel Agarosa.....	105
Lampiran 3G. Elektroforesis Gel Poliakrilamida.....	105
Lampiran 3H. 5X Bufer Sampel SDS dan Zimogram .....	105
Lampiran 3I. 1X Bufer Elektroforesis SDS .....	106
Lampiran 3J. Larutan Pewarna Gel .....	106
Lampiran 4. Hasil Analisa .....	107
Lampiran 4A. Hasil Skrining 1 .....	107
Lampiran 4B. Hasil Skrining 2 .....	110

Lampiran 3C. Hasil Skrining 3 .....	111
Lampiran 3D. Kurva Standar Glukosa .....	112
Lampiran 3E. Hasil Uji Aktivitas Selulase Selama 24 jam.....	113